

5. Dendrimeros y sus aplicaciones biomédicas

TERESA GONZALO Y M.^a ÁNGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ

*Laboratorio de Inmunobiología Molecular, Hospital General
Universitario Gregorio Marañón, Madrid.*

¿QUÉ SON LOS DENDRÍMEROS?

Los dendrimeros son moléculas poliméricas, versátiles y tridimensionales de síntesis química con forma bien definida, tamaño nanoscópico y con propiedades físico-químicas que recuerdan a las de las biomoléculas (Figura 5.1). Los dendrimeros han recibido gran atención en los últimos años debido a su posible utilización en aplicaciones tan variadas como catálisis a nanoescala, sensores químicos, micelas unimoleculares, imitación de la función de las enzimas, encapsulación de moléculas, reconocimiento molecular, agentes de diagnóstico y también como vehículos para el transporte de genes y fármacos.

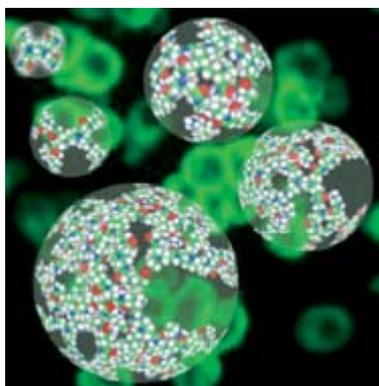


FIGURA 5.1. *Imágenes generadas por ordenador de nanopartículas. Imagen cortesía del Centro Nacional de Nanotecnología Biológica (Center for Biologic Nanotechnology), Universidad de Michigan-Ann Arbor.*

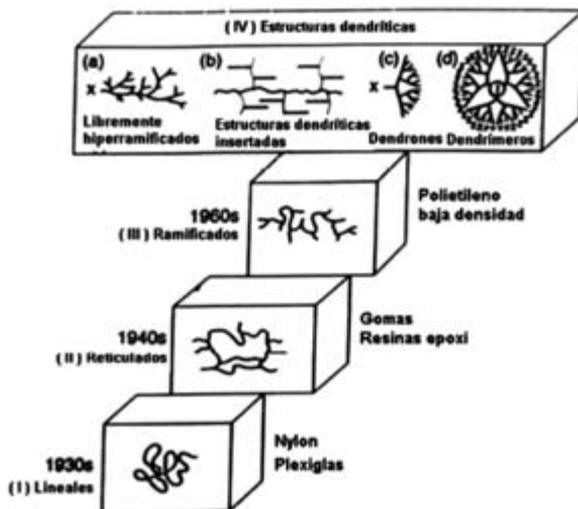


FIGURA 5.2. La estructura de los polímeros tradicionales (clases I a III) ha conducido a las estructuras dendríticas o clase IV en las que agrupan cuatro subclases de polímeros.

El término «dendrímero» procede del griego «dendron» que significa «árbol» o «rama», y el sufijo «mero», que significa «segmento» (1). Otro nombre que reciben los dendrimeros es el de «arboroles» (2), por su semejanza con las raíces de los árboles, con las dendritas de las neuronas, son conocidos también como árboles moleculares.

Estas moléculas híper-ramificadas presentan la ventaja de ser modificadas para presentar un grupo funcional deseado de forma multivalente, de forma que incremente sinérgicamente su acción. En química orgánica sintética, las estructuras dendríticas se consideran actualmente como la cuarta generación o clase de la arquitectura macromolecular que ha ido desarrollándose desde los primeros polímeros, en la década de los años treinta, hasta la actualidad (Figura 5.2) emergiendo como una nueva clase de polímeros llamados moléculas «en cascada», y desarrolladas por Vötgel y su grupo (3).

Más tarde, el desarrollo de estos diseños moleculares junto con el avance de las técnicas sintéticas dieron lugar al desarrollo de estructuras dendríticas más grandes, que fueron denominadas «dendrimeros» (4-6).

Los dendrimeros, que se engloban dentro del nivel nanoscópico (Figura 5.3), son moléculas con estructura bien definida y con baja polidispersidad en comparación con los polímeros tradicionales. A nivel molecular, la estructura rami-

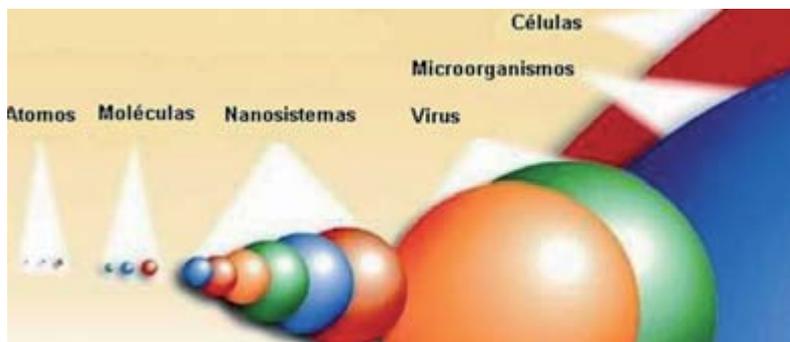


FIGURA 5.3. Niveles atómicos, molecular y nanoscópicos en comparación con tamaños virales, microbiológicos y celulares.

ficada origina en general estructuras semiglobulares o globulares, la mayoría con una alta densidad de grupos funcionales en su superficie junto con un volumen molecular «pequeño».

Los dendrímeros de mayor generación ocupan un volumen hidrodinámico menor comparado con los polímeros lineales, debido a su estructura globular. Sin embargo, en comparación con las proteínas, los dendrímeros presentan un mayor volumen hidrodinámico.

Para conocer mejor estas moléculas, se expone a continuación una amplia revisión acerca de distintos aspectos de la química y las aplicaciones biomédicas de las mismas desde una perspectiva histórica.

La estructura dendrímica está caracterizada por «capas» entre cada punto focal llamadas «generaciones». La definición exacta del término «generación» ha sido objeto de controversia, aceptándose generalmente el número de puntos focales (o puntos «cascada») que aparecen desde el core (núcleo central) hasta la superficie. Un dendrímero de generación 5 presenta por tanto 5 puntos focales entre el núcleo y la superficie. El núcleo es denominado a veces «generación cero» (G0), ya que no presenta ningún punto focal. En los dendrímeros tipo polipropileno-imina (PPI), el núcleo es 1,4-diaminobutano; para los dendrímeros poliamidoamina (PAMAM), el núcleo es bien amonio o bien 1,2 etilendiamina (Figura 5.4). En el caso de los PAMAM, los compuestos intermedios que presentan grupos carboxilato en superficie se denominan dendrímeros de «media generación» (ejemplo: G1.5 o G2.5).

El diseño de los dendrímeros puede estar basado en una gran variedad de grupos funcionales, como las poliaminas en el caso de los PPI (3), por una mez-

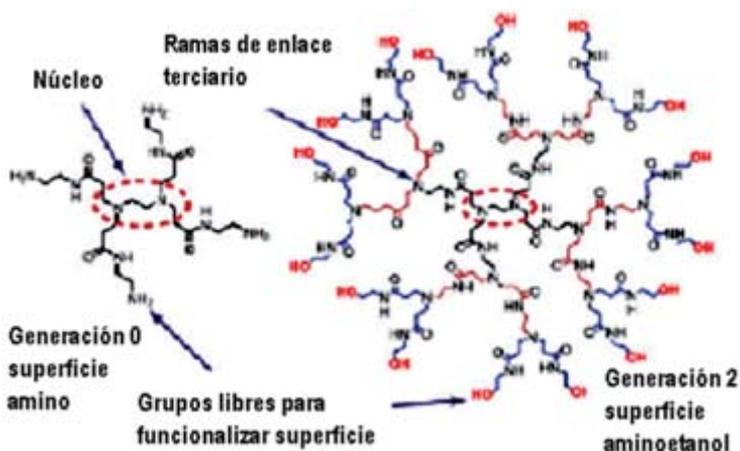


FIGURA 5.4. Dendrímero PAMAM generación 2, con un núcleo de etilendiamina (2 carbonos), y superficie aminoetanol. Adaptado de la web de Dendritech y Sigma-Aldrich. <http://www.dendritech.com>; <http://www.sigmaldrich.com>

cla de aminas y poliamidas, como los PAMAM (5) o estar constituidos por subunidades poli(aril éter) más hidrofóbicas (7). Otros ejemplos son los diseños basados en núcleos de carbohidratos (8) o de fósforo (9), o de calixarene (10).

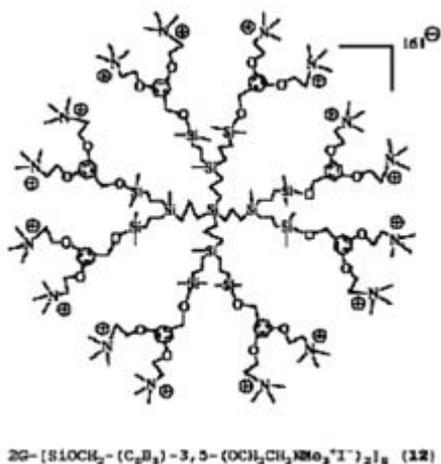


FIGURA 5.5. Dendrímero carbosilano (CBS) generación 2, con un núcleo de silicio y superficie terminal de aminas (11).

Recientemente, se han sintetizado unos dendrímeros conteniendo elementos como silicio, así llamados carbosilanos (CBS) (Figura 5.5) (11). Los dendrímeros dependiendo del grupo funcional que presentan en la periferia, pueden ser neutros o con carga (catiónicos o aniónicos) que pueden proveerle de diferentes características y funciones.

SÍNTESIS QUÍMICA, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS DENDRÍMEROS

Las estructuras dendríticas son sintetizadas en base a dos aproximaciones diferentes, síntesis divergente o convergente. En la aproximación divergente, el dendrímero es sintetizado desde el núcleo como punto de inicio y crecido generación a generación hasta la superficie. Sin embargo, el elevado número de reacciones que tienen que llevarse a cabo sobre una única molécula (con muchos sitios equivalentes de reacción), requiere unas transformaciones muy efectivas (con un rendimiento en torno al 99%) para evitar defectos. Incluso para transformaciones por generación muy eficaces el rendimiento de un dendrímero PPI «perfecto» será sólo aproximadamente del 25% por el método divergente (12). La alternativa de síntesis convergente desarrollada por Hawker y Frechet (13) comienza desde la superficie y finaliza en el núcleo, donde los segmentos de dendrímero (o dendrones) son acoplados todos juntos. En la aproximación convergente, solamente un pequeño número de sitios reactivos son funcionalizados en cada paso, dando lugar a un menor número de defectos, aumentando así el rendimiento. Cada generación sintetizada puede por tanto ser purificada, a pesar de que en los dendrímeros de gran generación esta tarea es más difícil, por las grandes similitudes entre los reactantes y el producto formado. Sin embargo, con una purificación apropiada en cada paso, se pueden obtener dendrímeros sin defectos por la alternativa convergente.

Al crecer la estructura dendrímica, aparecen varios compartimentos. La estructura se divide así en tres partes:

- La superficie multivalente, con un alto número de sitios reactivos potenciales.
- El armazón externo, justo por debajo de la superficie con un microambiente protegido de la parte externa por la superficie dendrímica.
- El núcleo, que en los dendrímeros de alta generación está protegido de las capas circunvalantes, creando un microambiente rodeado por las ramas dendríticas.

TABLA 5.1. *Impacto en el peso molecular y en el tamaño de los dendrímeros PAMAM según crece la generación. Adaptado de la web de Dendritech. <http://www.dendritech.com>.*

PAMAM dendrímeros Generación	Peso Molecular	Diámetro en nanómetros (nm)	Grupos en superficie
0	517	1,5	4
1	1,430	2,2	8
2	3,256	2,9	16
3	6,909	3,6	32
4	14,215	4,5	64
5	28,826	5,4	128
6	58,048	6,7	256
7	116,493	8,1	512
8	233,383	9,7	1024
9	467,162	11,4	2048
10	934,720	13,5	4096

El interior es por tanto un lugar con potencial para encapsular moléculas-huésped. Las tres partes del dendrímero pueden ser adaptadas específicamente para el propósito deseado (lograr sensores dendríticos, vehículos para fármacos, etc.). Por otra parte, la superficie multivalente de los dendrímeros de alta generación puede contener un alto número de grupos funcionales. Esto hace también a las superficies dendríticas y al almacén externo zonas con posibilidad de interacción con moléculas del huésped. En la Tabla 5.1 se puede observar el impacto en el tamaño del dendrímero PAMAM a medida que aumenta su generación.

Tras la aparición de los dendrímeros se sugirió que la nanoestructura tridimensional de los dendrímeros de mayor generación haría a estas estructuras similares en cierta forma a las proteínas (14). Sin embargo, a diferencia de las proteínas, que consisten en cadenas polipeptídicas plegadas, la estructura poli-ramificada del interior de los dendrímeros está mayoritariamente formada por enlaces covalentes, resultando de alguna manera en una estructura menos flexible.

Además, un dendrímero es en promedio menos compacto que una proteína (el interior no está compactado tan eficientemente como en una proteína); por último, el dendrímero contiene un número sustancialmente mayor de grupos funcionales en la superficie que una proteína de un peso molecular similar.

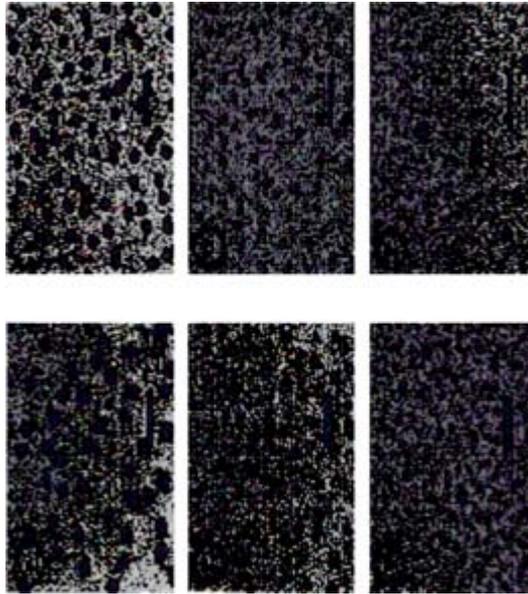


FIGURA 5.6. Dendrimeros de PAMAM teñidos positivamente con una solución acuosa al 2% de ácido fosfotúngstico y detectado por microscopía TEM. Dendrimeros de diferentes generaciones a) G10; b) G9; c) G8; d) G7; e) G6; f) G5. La escala indica 50 nm. Para G6 y G5, una cantidad de G10 se ha añadido como comparación. Adapted with permission from Jackson y colaboradores (14). Copyright 1998 American Chemical Society.

La técnica de TEM (Transmission Electronic Microscopy) mediante un haz de electrones altamente energéticos, permite entonces obtener una imagen individual de un dendrimeros, dando información directa de tamaño, forma, polidispersión y alineamiento de las moléculas. El grupo de Jackson y colaboradores (15), consiguieron visualizar con éxito diferentes generaciones del dendrimeros PAMAM utilizando esta técnica (Figura 5.6).

Estudios de dinámica molecular llevados a cabo por varios grupos muestran que los dendrimeros, de forma similar a las proteínas, pueden adoptar una forma nativa (más compacta) o desnaturalizada (extendida), dependiendo de la polaridad, la fuerza iónica y el pH del solvente (Figura 5.7). Los dendrimeros PPI y PAMAM que contienen aminas primarias en su superficie muestran conformaciones extendidas a pH ácido debido a las repulsiones electrostáticas entre las aminas terciarias protonadas del interior y entre las aminas primarias de la superficie (16). A $\text{pH} > 9$, se produce un plegamiento como consecuencia de los puentes de hidrógeno entre las aminas terciarias interiores y las primarias de la superficie, resultando en un núcleo más denso.

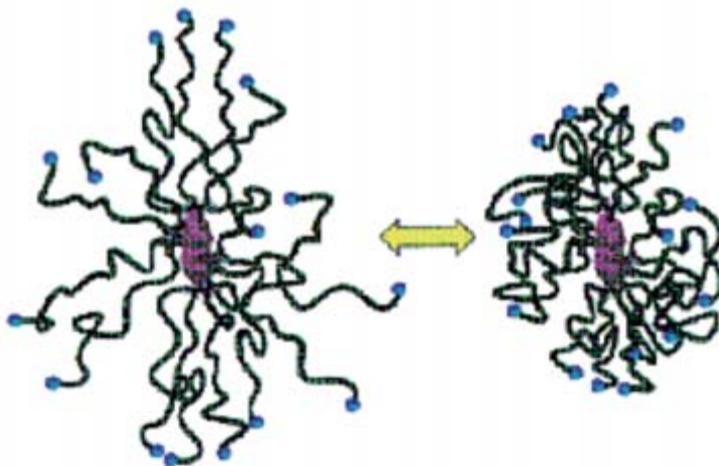


FIGURA 5.7. Simulación de comportamiento de solubilidad de dendrímeros de PAMAM frente a pH ácido (izquierda) y su plegamiento y compactación a pH básico (derecha).

SIGNIFICACIÓN DE LA MULTIVALENCIA EN LAS INTERACCIONES BIOLÓGICAS

En la Naturaleza nos podemos encontrar con muchos ejemplos de interacciones multivalentes, desde las uniones divalentes de los anticuerpos y de muchos receptores biológicos hasta las interacciones multivalentes de las patas de la salamandrina que se cuentan por millones (18). La multivalencia ha demostrado conllevar una actividad incrementada comparando con las interacciones univalentes. El aumento sinérgico de una actividad (ej. de una actividad catalítica, o de la afinidad de una unión, etc.) de un sistema multivalente respecto a uno monovalente es denominado «efecto dendrítico» (8), (19). El efecto dendrítico es atribuido a una acción cooperativa en un sistema multivalente que resulta en un efecto mayor que el que correspondería a la valencia del sistema (efecto aditivo). La multivalencia puede incrementar además la especificidad de una interacción dada (20), esencialmente incrementando la afinidad por el ligando. Los sistemas biológicos están repletos de ejemplos de interacciones multivalentes (21), y esto puede ser debido a que las interacciones multivalentes proveen de:

- Un incremento en la fuerza de unión en uniones de baja afinidad respecto a los ligandos simples.
- Interacciones célula-célula más eficientes.

Los factores que pueden jugar un papel en estas interacciones incluyen obviamente la geometría de los ligandos y la flexibilidad de su unión al dendrímero (22). Los dendrímeros tienen por tanto el potencial de imitar la multivalencia de algunos sistemas biológicos de una manera muy bien definida.

CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DE LOS DENDRÍMEROS EN BIOMEDICINA

Para poder utilizar un dendrímero en biomedicina, éste debe cumplir varias condiciones de importancia crucial:

- No ser tóxicos.
- No inmunogénicos (excepto para vacunas).
- Atravesar barreras biológicas: barrera hematoencefálica, membranas celulares, intestino, pared vascular...
- Ser estables y permanecer en circulación el tiempo necesario para tener el efecto clínico buscado.
- Ser capaz de dirigirse a dianas específicas.

Toxicidad

No sólo los dendrímeros catiónicos, también las macromoléculas catiónicas en general, causan desestabilización de la membrana celular induciendo lisis celular (23). El mecanismo exacto de la citotoxicidad causada por estas estructuras no se conoce completamente. Inicialmente, estudios comparativos de citotoxicidad sobre diferentes líneas celulares concluyeron que los PAMAM amino-terminados (Starbust[®]) presentaban una menor citotoxicidad que los dendrímeros basados en lisina. Sin embargo, cuando los PAMAM fueron ensayados sobre células de adenocarcinoma humano Caco-2 (24, 25), mostraron una toxicidad importante. La toxicidad demostró ser dependiente de la generación, siendo los dendrímeros de mayor generación los más tóxicos (24, 25). Esto está de acuerdo con el hallazgo general de que los polímeros con mayor peso molecular son los que presentan una mayor citotoxicidad (26). Además, los estudios de hematotoxicidad con los PAMAM amino terminados demostraron que dichos dendrímeros presentaban un efecto hemolítico sobre una solución de hematíes de rata que también se incrementaba con la generación del dendrímero (27). Estudios de miotoxicidad

sobre músculos de rata Sprague-Dawley mostraron que los PAMAM G4 amino terminados eran más miotóxicos que los liposomas y proteínas ensayados (28). Estudios sobre células de neuroblastoma en cultivo con distintas concentraciones de dendrímeros PEI, PPI y PAMAM durante una semana mostraron toxicidad de los dos últimos (29). Estudios recientes han demostrado que los PAMAM amino-terminados, con una estructura de mayor tamaño (por ejemplo grupos alquilo) presentan mayor toxicidad que los PAMAM con los grupos amino libres.

Para los PPI amino terminados se ha encontrado un efecto similar de toxicidad generación dependiente (31). Como sucede para los PAMAM, los PPI con mayor generación han demostrado ser los más hemolíticos en hematíes de rata (27).

En resumen, los dendrímeros amino-terminados suelen ser citotóxicos (27). La citotoxicidad de los dendrímeros catiónicos puede ser debida a las interacciones entre la superficie catiónica del dendrímero y la superficie cargada negativamente de las membranas celulares, permitiendo a dichos dendrímeros adherirse a la superficie celular y dañarla, causando la lisis celular.

Sin embargo, los dendrímeros PAMAM con grupos carboxilato en su superficie (aniónicos) presentan una menor toxicidad que los dendrímeros catiónicos amino terminados, según estudios realizados en células Caco-2 (24). La toxicidad de los dendrímeros no está determinada solamente por la naturaleza de los grupos de superficie, sino también por la naturaleza química del esqueleto dendrimérico. Dendrímeros con esqueleto aromático poliéter con grupos carboxilato aniónicos en superficie han demostrado ser hemolíticos para hematíes de rata tras 24 horas de incubación. Pudiera ser que el interior aromático del dendrímero causara hemólisis debido a contactos hidrofóbicos con la membrana. (27). Se ha demostrado recientemente que los dendrímeros CBS con grupos aniónicos en la superficie (sulfonato o carboxilato) presentan una menor toxicidad que los mismos CBS con grupos funcionales catiónicos (32).

La utilización de aditivos puede reducir la citotoxicidad de forma importante en los dendrímeros amino-terminados. Por ejemplo, la adición al medio de cultivo de suero de ternera fetal reduce la toxicidad de dendrímeros PAMAM modificados con el fluoróforo *Oregon-Green* sobre células de carcinoma humano HeLa respecto al PAMAM sólo (33). Además, la toxicidad de los PAMAM disminuye cuando forman complejos con ADN (34, 35). Lo mismo ocurre para los PPI y para los CBS (36, 37). Esto indica que la unión no covalente entre los dendrímeros y el ADN, ARN o las proteínas lleva a un efecto de atenuación del plicación, similar al que se obtiene por modificación covalente de las aminas de superficie. Sin embargo, estas observaciones son contradichas por

otros estudios de citotoxicidad de complejos entre policonjugados y ADN (38). Estos estudios muestran la misma o mayor toxicidad cuando un dendrímero no modificado PAMAM se une a ADN; en este caso, la toxicidad no puede ser atribuida a la carga electrostática de superficie, sino a la gran cantidad de ADN introducido en las células por el dendrímero, lo cual puede llevar a apoptosis (39).

La toxicidad de los dendrímeros depende en gran medida de las líneas celulares sobre las que se ensayen, existiendo unas líneas más sensibles que otras. Los cultivos primarios así mismo son en general más sensibles a la toxicidad ante cualquier desafío con una droga que las líneas de cultivo establecidas o inmortalizadas.

Sólo hay unos pocos estudios acerca de la toxicidad de los dendrímeros *in vivo*. En general, la inyección en ratones de concentraciones de 10 mg kg^{-1} de PAMAM hasta generación 5 no parecen ser tóxicas, independientemente de si presentan modificaciones o no en la superficie (26, 40). Es más, la inyección de PAMAM no modificados junto con ovoalbúmina en ratones no fue tóxica *in vivo* (no se observó pérdida de peso, ni formación de granulomas, ni hemólisis o inflamación) (41). Nuevos dendrímeros poliésteres con terminaciones hidróxido o metóxido han demostrado no ser tóxicos tanto *in vitro* como *in vivo* (42, 43). A altas concentraciones (40 mg mL^{-1}) estos poliésteres inducen cierta inhibición del crecimiento celular *in vitro* pero no se observa mortalidad celular; cuando se inyectan en ratones, no se observaron fenómenos de toxicidad aguda ni a largo plazo. Las propiedades no tóxicas hacen de estos nuevos dendrímeros moléculas prometedoras biodegradables para el transporte de fármacos, ya que el dendrímero puede ser destruido por enzimas hidrolíticas después de la liberación del principio activo.

Inmunogenicidad

Los estudios sistemáticos iniciales realizados con dendrímeros PAMAM no modificados mostraron baja o ninguna inmunogenicidad de los dendrímeros de generaciones entre G3 y G7 (26, 41). Sin embargo, estudios posteriores mostraron algún grado de inmunogenicidad de estos dendrímeros encontrando que la modificación de los PAMAM aminoterminados con cadenas de polietilenglicol (PEG) reduce la inmunogenicidad y aumenta la semivida plasmática de los PAMAM en comparación con los PAMAM no modificados (44). Las cadenas de PEG aumentan la hidrofilia del dendrímero, creando una superficie altamente hidratada que induce pocas alteraciones con el microambiente fisiológico que le rodea. Por otro lado, la superficie del dendrímero puede ser modificada con antígenos o epítopos T dependientes creando compuestos altamente inmunogénicos, característica intrínseca en la creación de vacunas.

Capacidad de transfección y transvasación

Los dendrímeros pueden formar complejos con el ADN o ARN y transportar éste último al interior de las células, con menos daño en la membrana celular y menos efectos tóxicos comparados con los dendrímeros libres. Se han estudiado distintas aproximaciones para aumentar la capacidad de transfección de los complejos ADN-dendrímeros (dendriplexes) (35, 45). Los estudios de transfección *in vitro* mediante la adición de cantidades moderadas de beta-ciclodextrinas sulfonadas (BCD) concluyeron que se aumentaba la capacidad de transfección de los dendriplexes ADN-PAMAM, debido a la unión iónica entre los sulfonatos cargados negativamente de los BCD y los grupos catiónicos de los PAMAM, llevando a una modificación de la composición del complejo ADN-dendrímero (46). En los dendrímeros de polilisina, la eficacia de transfección se aumenta añadiendo en su superficie PEG; sin embargo, el porcentaje global de transfección con estos dendrímeros es bajo, probablemente por la liberación moderada de ADN desde los mismos (47). Las investigaciones concluyen generalmente en que la forma esférica de los dendrímeros no constituye una ventaja para el transporte de ADN al interior celular, mostrando los dendrímeros fragmentados por calor o la acción de detergentes una eficacia superior de transfección respecto a los no. En cuanto a la capacidad de extravasación, estudios *in vivo* con los PAMAM demostraron que el tiempo de extravasación aumenta con el tamaño y el peso molecular de los dendrímeros (49). Estudios *in vitro* con epitelio intestinal de rata mostraron que la tasa de transferencia a través del epitelio de dendrímeros PAMAM fue más rápida que para otros polímeros estudiados, sugiriendo que estos dendrímeros pudieran ser utilizados en sistemas de transporte oral (50).

Aplicaciones biofarmacéuticas de los dendrímeros

El desarrollo de nuevos nano-polímeros biocompatibles se ha convertido en un importante objetivo de las compañías dedicadas a la Biotecnología. Las posibles aplicaciones biofarmacéuticas de estos nanopolímeros han demostrado ser múltiples:

- Transporte de fármacos, con el fin de aumentar la biodisponibilidad y la fracción activa de los mismos; liberación controlada de fármacos, con el fin de prolongar y/o distribuir mejor su efecto a lo largo del tiempo.
- En terapia génica: una de las facetas más estudiadas de estos nanopolímeros ha sido la relacionada con su potencial para el transporte de ADN, ARN, plásmidos al interior de las células.

- En vectorización de fármacos: como glico-transportadores.
- En administración transdérmica de fármacos (iontoforesis).
- Como *antivirales*, interfiriendo con el ciclo replicativo de virus y bacterias, postulándose su posible aplicación en dispositivos barrera para la prevención de enfermedades de transmisión sexual, como los microbicidas.
- Como antibacterianos.
- Como antitumorales.
- Como desnaturalizantes de proteínas.
- Como vacunas actuando como soporte estructural de péptidos antigénicos en el diseño de estrategias de vacunación.

Dendrimeros como transportadores de fármacos

Los dendrimeros de tipo PAMAM y PPI, con un gran peso molecular y superficies multivalentes, son macromoléculas con potencial aplicación en transporte de fármacos. La interacción con el fármaco puede tener lugar bien en las cavidades del núcleo dendrimerico (endo-receptor), bien en la superficie multivalente del armazón externo del dendrimerico (exo-receptor). Un ejemplo de dendrimerico endo-receptor es la «caja dendrimerica» (51), donde un PPI G5 es modificado en superficie con grupos fenil-alanina, que protegen el armazón externo haciéndole más denso. Durante el proceso de crecimiento del dendrimerico, se encapsulan en su interior moléculas de diferente tamaño. El dendrimerico puede portar 4 moléculas grandes (Rosa de Bengala) y 8-10 pequeñas (ácido p-nitrobenzoico). Cuando este dendrimerico se trata con ácido fórmico, el armazón exterior se abre permitiendo la liberación de las moléculas hospedadas en su interior.

Guadarrama y colaboradores elaboraron unos modelos dendrimericos para poder observar la localización de las moléculas de ibuprofeno y avermectina (Figura 5.8) para poder evaluar las interacciones entre el dendrimerico y los fármacos por medio de cálculos de dinámica molecular (52).

Frechet propuso una micela unimolecular basada en una red dendrimerica de poliariéster con grupos carboxilato en superficie que era capaz de disolver moléculas apolares (7). Este tipo de dendrimeros serían buenos candidatos para el transporte de compuestos hidrofóbicos bioactivos, como los esteroides.

Mitchell y col. modificaron las aminas de superficie de los dendrimeros PAMAM con un derivado del glicerol (tris(hidroximetil)aminometano), creando

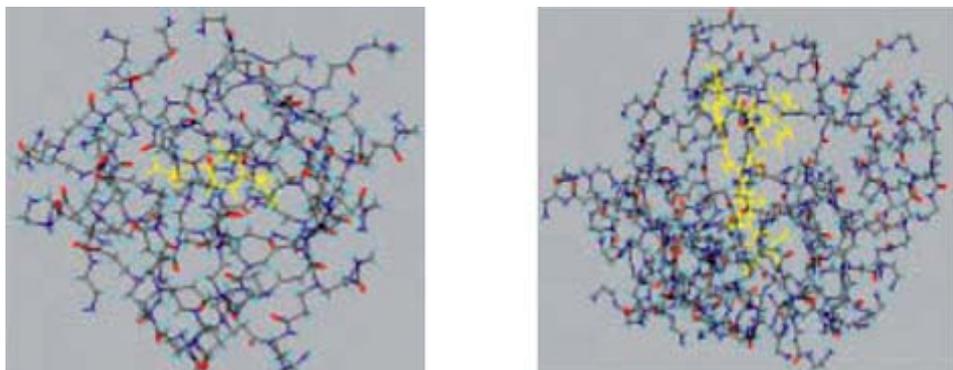


FIGURA 5.8. *Proceso de encapsulación del dendrímero PAMAM de tercera generación con las moléculas de ibuprofeno (derecha) y avermectina (izquierda) encapsulados en color amarillo (52).*

dendrimeros hidrosolubles capaces de unir compuestos aromáticos acídicos antibacterianos, los cuales pueden ser liberados cuando baja el pH (53).

Los dendrímeros de estructura carbosilano, CBS, hidrosolubles y biocompatibles desarrollados por Ortega y colaboradores (10) propiciaron nuevas investigaciones con estos dendrímeros en el transporte de fármacos polianiónicos, tales como la heparina, algunos antiinflamatorios no esteroideos como la indometacina, ácido acetilsalicílico, etc, evitando los efectos indeseados de la unión de estos fármacos a proteínas del plasma o a RNAsas (54). Debido a su labilidad a pH ácido, podrían ser útiles para la administración de fármacos aniónicos de forma pH dependiente (36, 55).

Dendrimeros en terapia génica

El interés de los dendrímeros como transportadores de fármacos se ha focalizado principalmente en su capacidad de transporte de ADN o ARN al interior de las células (transporte de genes o de secuencias cortas de ADN o ARN inhibidoras) en terapia génica sustitutiva o terapia antisentido. En este particular existen múltiples estudios con PAMAM o PPI amino-terminados no modificados como agentes de transfección no virales de ADN al núcleo (34, 35, 56-59).

Como se puede observar en la Figura 5.9, los dendrones se distribuyen a lo largo de su linealidad con las moléculas de DNA atrapadas alrededor de las cargas positivas del dendrón (60). Se ha encontrado que los dendrímeros parcialmente degradados o fragmentados presentan una mayor capacidad de transfec-

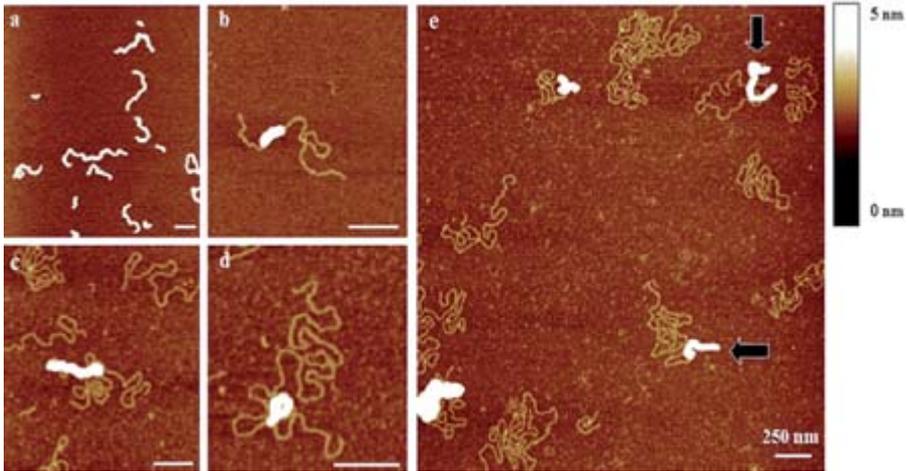


FIGURA 5.9. Imágenes de dendrones con DNA complejo obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido (Scanning Force Microscopy). Las escala representa 250 nm. Adaptado con permiso de Gossl y colaboradores (60). Copyright 2002 American Chemical Society.

ción; a esto se le llama «activación» del dendrúmero, que puede ser por rotura hidrolítica de los puentes amida (48, 61, 62); en comparación con los dendrúmeros intactos, los dendrúmeros degradados parcialmente tienen una estructura más flexible (menos puentes amida) y forman una estructura más compacta con el ADN, lo cual favorece la transfección por vía endocítica (62). Además, la transfección es mayor con un exceso de aminas primarias del dendrúmero frente a grupos fosfato del ADN, dotando al complejo de una carga total positiva, probablemente por favorecer la adhesión del complejo a la superficie celular, cargada negativamente. Los dendrúmeros PPI de mayor generación (que no contienen amidas) son demasiado citotóxicos para ser usados como vehículos no virales, sin embargo los de baja generación pudieran ser una buena opción (31).

Los dendrúmeros amino terminados no modificados transportan el ADN hasta la membrana y pueden ayudar al proceso de transfección induciendo disrupción de la misma. En teoría el ADN desnudo, cargado negativamente, sería repelido por la superficie externa celular, también cargada negativamente.

Por otro lado los dendrúmeros CBS pueden tener una labor fundamental en la liberación controlada de fragmentos de ADN y siRNA de interferencia, como muestra Weber y colaboradores (37). En la ilustración de la Figura 5.10 se observa la transfección eficaz de oligonucleótidos antisentido por medio de dendrúmeros CBS en células de la sangre.

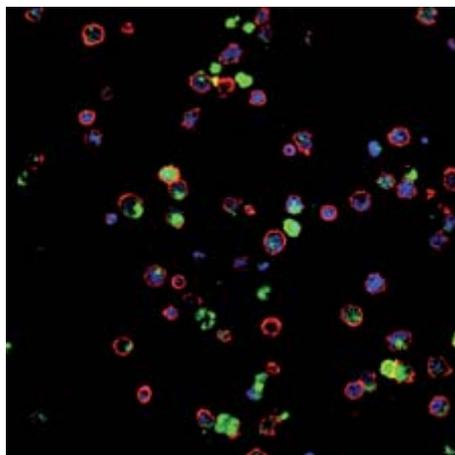


FIGURA 5.10. Imagen de Microscopía confocal de células mononucleares de sangre periférica (PBML) transfectadas con un oligonucleótido antisentido fluorescente REV mediante un dendrímero carbosilano. Membrana celular está marcada con Texas Red en rojo, el núcleo celular está marcado con DAPI en color azul, y el oligonucleótido antisentido está marcado con FITC en color verde. Imagen cortesía laboratorio Inmunobiología Molecular (Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid).

Dendrímeros en vectorización de fármacos

Una forma de direccionar los dendrímeros hacia las células deseadas es la de funcionalizarlos con ácido fólico, que es captado por las células por la vía del receptor de folato, el cual está sobre-expresado en las células tumorales. Los dendrímeros funcionalizados de esta forma tendrían preferencia por entrar en las células tumorales sobre las células normales, con lo cual se convierten en buena molécula base para el transporte de fármacos citotóxicos (63, 64). Muy recientemente, dendrímeros PAMAM modificados con folato en su superficie han sido utilizados como transportadores de isótopos de boro en terapias de captura de neutrones en cáncer (65). Los dendrímeros PAMAM conjugados con cisplatino actúan como un transportador macromolecular de platino, un fármaco antitumoral. Este complejo dendrímero-platino da lugar a una liberación controlada del platino, llevando a una mayor acumulación del mismo en tumores sólidos, con menor toxicidad que el cis-platino libre (66). Complejos PAMAM-plata que liberan esta última lentamente han demostrado actividad antibacteriana contra varias bacterias Gram-positivas (67).

Las aproximaciones mencionadas están basadas en uniones no covalentes entre el fármaco y el dendrímero. Una alternativa es la unión covalente mediante

un enlace biodegradable. Dendrimeros con un núcleo 1,4,7,10 tetraazaciclododecano con aminas primarias en superficie y modificados parcialmente con 1-bromoacetil-5-fluoro-uracil para formar una unión imida lábil liberan de forma controlada 5-fluoro-uracilo, un potente antitumoral, mediante hidrólisis de la imida a pH fisiológico *in vitro* (68).

Los carbohidratos son una clase de moléculas importantes en el reconocimiento biológico. Las proteínas de unión a carbohidratos son denominadas lectinas (69). Las interacciones lectina-carbohidratos han sido descritas en numerosos casos en el sistema inmune (en los eventos que llevan a activación celular), en infecciones virales y bacterianas, en relación con el cáncer y el crecimiento celular, etc. Los fármacos basados en carbohidratos tienen por tanto interés como anti-adhesinas microbianas, antagonistas de toxinas, o bien como fármacos antiinflamatorios, antivirales y anticancerosos. Un ejemplo son los glicodendrimeros, preparados mediante la unión de las aminas terminales de dendrimeros PAMAM G3 o dendrimeros de lisina a manosa-isotiocianato, ácido siálico o lactosa. Con el aducto octamérico se consigue aumentar 300-400 veces la afinidad por la lectina manosa específica del monocito-macrófago respecto a la afinidad del monosacárido (manosa) (70). Los glicodendrimeros han sido utilizados como antígenos para vacunas (71, 72). Glicodendrimeros con el antígeno T- asociado beta Gal 1-3 alfa-GalNAc disacárido se ensayaron para unión a la lectina específica de galactosa (73). Éstos pueden ser utilizados en la detección de tumores que expresen receptores de antígenos T, y para vehiculizar fármacos hacia los mismos. En conclusión, los dendrimeros glicosilados pueden mimetizar los glicoconjugados naturales e interactuar eficientemente con los receptores carbohidrato naturales.

Dendrimeros en administración transdérmica de fármacos

En el caso de algunos fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos, la administración transdérmica se está estudiando para obviar las vías más clásicas (oral, parenteral) con el fin de evitar efectos secundarios tales como los gastrointestinales o la nefrotoxicidad. La presencia del dendrimer, en unión con los fármacos a administrar, induce alteraciones en la piel que aumenta su permeabilidad (74).

Existe la posibilidad de evaluar dendrimeros, también los carbosilano, para facilitar la administración por iontoforesis de fármacos aniónicos, dotándolos de una carga total positiva que facilite su paso a través de la piel al aplicarse una diferencia de potencial entre la parte externa e interna de la misma. En este particular merece especial atención la posible administración de insulina a través de la piel.

Dendrímeros como antivirales

En general, los dendrímeros antivirales funcionan mimetizando artificialmente las superficies celulares aniónicas, por lo tanto estos dendrímeros son diseñados con grupos aniónicos de superficie como residuos sulfonato o de ácido siálico, que son carbohidratos ácidos presentes en la superficie celular. En otras palabras, el dendrímero compite con la superficie celular por la unión al virus, llevando a una menor probabilidad de infección de la célula por parte de éste (Figura 5.11). Dendrímeros de polilisina modificados con residuos de naftil y con grupos sulfonato de superficie han demostrado inhibir la infección por Herpes Simplex *in vitro* (40), inhibiendo no sólo la entrada sino también pasos posteriores de la replicación viral (75); lo mismo ocurre con PAMAM modificados covalentemente con residuos naftil-sulfonato: en este caso son capaces de inhibir la replicación del VIH tanto a nivel de la entrada celular como en pasos posteriores, interfiriendo con la retrotranscriptasa y la integrasa (76, 77).

PAMAM funcionalizados con ácido siálico inhiben eficientemente la infección por Influenza A H3N2; sin embargo, la inhibición está limitada a este subtipo de Influenza (78). Se ha diseñado también un dendrímero con grupos amida de superficie que funciona como inhibidor del virus respiratorio sincitial. El mecanismo exacto no es del todo conocido, pero parece que es debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos periféricos del dendrímero con la proteína de fusión del virus.

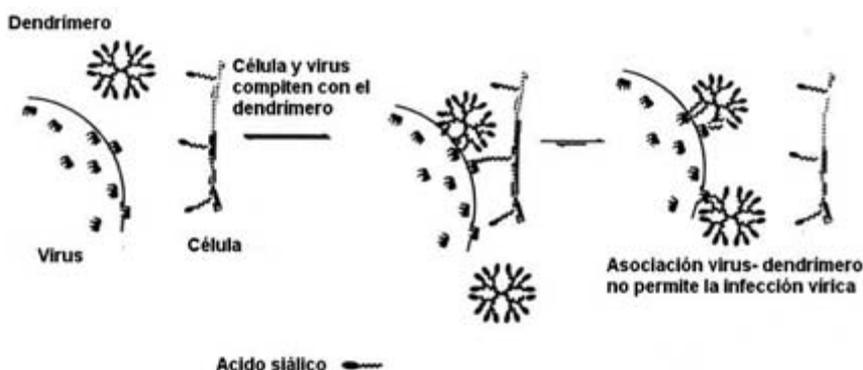


FIGURA 5.11. *Mecanismo de acción de los dendrímeros como antivirales.*

Dendrimeros como antibacterianos

En contraste con los dendrimeros antivirales, los dendrimeros antibacterianos contienen generalmente grupos catiónicos de superficie tales como aminas o grupos tetraalquil amonio. Estos dendrimeros catiónicos se adhieren y dañan la membrana bacteriana, causando la lisis de la bacteria. Dendrimeros PPI con grupos alquil amonio terciarios de superficie han demostrado una amplia actividad bactericida tanto contra Gram positivos como contra Gram negativos (79, 80). Estos dendrimeros presentan una mayor capacidad bactericida que otros polímeros hiperramificados.

Dendrimeros de polilisina han demostrado inhibir la adhesión de *E. coli* a eritrocitos equinos en ensayos de hemaglutinación (81). Los dendrimeros CBS de generación 5 y 6 demostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram+ y Gram- (82). Según De la Mata y colaboradores, esta actividad disminuye ligeramente cuando la generación de dendrimeros incrementa, principalmente en bacteria Gram-, debido principalmente a la diferencia en estructura de la pared celular en estos organismos.

Dendrimeros como antitumorales

En tratamientos fotodinámicos, el fármaco se convierte en tóxico tras irradiación debido a la formación *in situ* de pequeñas cantidades de oxígeno en estado singlete, el cual tiene efectos fisiológicos deletéreos (83). En comparación, el fármaco no debe ser tóxico bajo condiciones de no irradiación (pro-fármaco). Se han publicado algunos artículos acerca de dendrimeros portadores de drogas fotosensibles; por ejemplo, conteniendo ácido 5-aminolevulínico en la periferia, siendo éstos prometedores agentes para tratamiento de tumores de queratinocitos (84). Dendrimeros basados en poliarileter portando protoporfirina como fotosensibilizador han sido evaluados como candidatos para el tratamiento de tumores sólidos (85).

Dendrimeros como desnaturizantes de proteínas

Ciertos tipos de dendrimeros actúan disminuyendo la constante dieléctrica y la viscosidad del agua y desordenando su estructura regular mediante la reorganización de las moléculas de agua en la superficie del dendrimer. Esto lleva a desfavorecer las interacciones hidrofóbicas, lo cual es muy desestabilizador para

la mayoría de las estructuras terciarias de las proteínas (desnaturalización). Las sustancias que producen este efecto se llaman «caotropos», y ejemplos clásicos de los mismos son sales como el $MgCl_2$, la urea, el cloruro de guanidio, el tiocianato sódico, el tiocianato de guanidio o disolventes orgánicos como el acetonitrilo, propanol y metanol. Generalmente los caotropos sirven para desnaturalizar y solubilizar proteínas. Así, hay un ejemplo sumamente interesante de la aplicación de dendrímeros como desnaturalizantes de proteínas es su uso para disolver agregados de proteínas priónicas (86). Las proteínas priónicas son capaces de adoptar una estructura-conformación patogénica que causa neuropatías mortales llamadas encefalopatías espongiformes (Creutzfeldt-Jakob, mal de las «vacas locas», *scrapie* ovino, etc). Estas proteínas forman agregados insolubles, los cuales se encuentran en los cerebros de los individuos afectados. Estos agregados son solubles sólo en solventes que contienen tanto detergentes como desnaturalizantes (típicamente cloruro de guanidio 6 M). Sin embargo, estos agregados pueden ser solubilizados por dendrímeros catiónicos como los PEI, PPI, y los PAMAM; los de mayor generación con mayor número de aminas en superficie son los más eficaces. Lo destacable es que no se han descrito otros compuestos capaces de disolver agregados priónicos ya formados previamente.

Dendrímeros en vacunas

Es bien sabido que las moléculas de bajo peso molecular (como los péptidos) no son muy inmunogénicas o bien inducen una respuesta inmune débil tras su inyección en el huésped. Sin embargo, este problema puede ser solucionado incrementando su peso molecular bien mediante polimerización o bien mediante acoplamiento a un transportador de alto peso molecular multivalente (tradicionalmente una proteína) (87). Para la preparación de inmunógenos muy definidos y altamente reproducibles como los que se necesitan para la fabricación de vacunas, otros tipos de transportadores son muy deseables, como los dendrímeros, con una estructura muy definida y con muchos grupos funcionales capaces de unir antígenos en su periferia. Tam y col desarrollaron un dendrímero MAP (del inglés «multiple antigenic peptide») (88, 89), el cual puede ser sintetizado con mezclas definidas de epítopos B o T. La mayoría de las inmunizaciones *in vitro* ensayadas con dendrímeros MAP han sido realizadas con adyuvantes tradicionales: en el ensayo de Moreno y col. (90), se ensayó la capacidad de inducción de la producción de anticuerpos por parte de hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund y saponina en combinación con una estructura MAP que contenía péptidos de *Plasmodium falciparum* estimuladores de células T y B. Ota y col. demostraron que las estructuras MAP eran procesadas por las células presentadoras de antígenos en la misma forma que los antígenos derivados de

patógenos intracelulares (ejemplo: virus), dando lugar a una potente respuesta inmune, incluyendo la producción de células T citotóxicas (91). Los dendrímeros MAP son construcciones asimétricas en forma de cuña formadas por sucesivas generaciones de residuos de lisina. Estos dendrímeros presentan un gran número de aminas primarias que pueden ser acopladas a antígenos de bajo peso molecular, con la intención de aumentar la inmunogenicidad, obviando la necesidad de utilizar proteínas transportadoras. Este tipo de estructuras MAP están en ensayo para obtener vacunas para la malaria y la enfermedad «pié-boca» (92-94).

Las estructuras MAP han sido utilizadas también para transportar antígenos no peptídicos como carbohidratos, haptenos, etc, en el contexto de vacunas: un ejemplo es su estudio en vacunaciones contra tumores de colon en rata con aluminio como adyuvante (95).

Por otra parte, los dendrímeros pueden ser utilizados ellos mismos como adyuvantes en vacunaciones (un adyuvante es una sustancia que aumentan la inmunogenicidad de un antígeno deseado cuando los dos se administran en conjunto) (41).

Dendrímeros actualmente en fase preclínica o clínica

Debido al gran interés que han despertado los dendrímeros en los últimos 20 años, algunos de ellos se encuentran en fases preclínicas, y uno sólo de ellos en fase clínica.

En la actualidad los dendrímeros son moléculas con un alto grado de especialización, y como hemos analizado en el apartado anterior, pueden ser aplicados a diversas ramas de la medicina: tratamiento, prevención y diagnóstico.

En la Tabla 5.2 se enumeran algunas patentes mundiales de fármacos por distintas instituciones, empresas farmacéuticas y empresas de biotecnología.

Como diagnóstico se ha encontrado una aplicación interesante de un dendrímero de gadolinio utilizado para diagnosticar fallo renal agudo inducido por sepsis mediante imágenes de resonancia magnética (96).

En el campo de la prevención, podemos encontrar dendrímeros utilizados como antivirales para la prevención de la infección por VIH (97). El dendrímero SPL7013 (Vivagel[®], Starpharma Pty, Ltd.) está siendo desarrollado como fórmula de aplicación tópica vaginal para impedir la infección del virus durante el acto sexual. Este dendrímero es actualmente el primero y el único tratamiento basado en dendrímeros que está autorizado para proceder con los ensayos clínicos por la FDA y la fase I de ensayos en humanos ya ha sido testada con éxito (97).

TABLA 5.2. *Muestra de patentes de dendrímeros y aplicaciones terapéuticas y diagnósticas de los mismos.*

Patente	Licenciario	Título	Aplicación
WO 2008133954	Genzyme Corporation	Dendrímeros amido-amina	
WO 2008121153	University of Utah	Métodos de producción y usos de los dendrímeros	Excipientes farmacéuticos
WO 2008089256	Cappella, Inc	Terapéutica con dendrímeros	Lesiones inflamatorias en cáncer
JP2008050283	Saitama University	Acidos siálicos tipo tioglicósido unidos a dendrímeros	Influenza
WO 2008017122	Starpharma Pty.Ltd. Baker Medical Research Institute	Agentes de contraste de dendrímeros polilisina	
WO 2008017125	Starpharma Pty.Ltd.	Agente terapéutico de dendrímero de polilisina	
WO 2008011967 DE 102006035041	Patente Merck GmbH	1,4-Bis(2-tienilvinil)benzol derivados y su uso	
WO 2008011047	Genzyme Corp.	Dendrímeros aminados	Hiperfosfatemia
WO 2008008483	University of Michigan	Métodos de producción y usos de los dendrímeros	Diagnóstico de cáncer
WO 2007149500	Dendritic Nanotechnologies, Inc.	Formulaciones conteniendo dendrímeros híbridos	

Como tratamiento avanzado en preclínica los dendrímeros (G5) están siendo estudiados en el grupo de James Baker y colaboradores (98) como transportador de un fármaco citostático, el metotrexato (MTX), y funcionalizados con ácido fólico (FA) en su superficie. El conjugado resultante, G5-FA-MTX ha demostrado su eficacia y especificidad en células con receptor de ácido fólico *in vitro* e *in vivo*. Los estudios en fases clínicas deberán demostrar que este conjugado tiene una viabilidad para el tratamiento del cáncer.

En la Tabla 5.3 se muestran algunos dendrímeros en su fase preclínica o clínica más avanzada, donde podemos observar la gran diversidad de aplicaciones que pueden tener los dendrímeros que actualmente están siendo objeto de intensas investigaciones en todo el mundo.

Tabla 5.3. *Fases clínicas y preclínicas de los dendrímeros en los que se busca una aplicación terapéutica, diagnóstica o preventiva.*

Fase	Código	Producto	Aplicación	Mecanismo de acción	Organización
Clínica I	SPL 7013	Dendrímtero	Prevención HIV y herpes genital	Antiviral tópico vaginal	Starpharma Pty, Ltd.
Preclínica	DAB-Am64-(1B4M-Gd) ₆₄	Complejo dendrímtero-gadolinio	Diagnóstico por RMN de cáncer hepatobiliar		Universidad Kyoto y National Cancer Institute
Preclínica		Dendrímteros	Fármacos oncolíticos		College Universitaire de Saint-Boniface y Ohio State University
Preclínica		Dendrímteros	Fármacos oncolíticos		College Universitaire de Saint-Boniface y Ohio State University
Preclínica	pGEG.FasL		Terapia génica	Terapia cáncer de próstata	Kyoto Prefectural University of Medicine
Diagnóstico biológico	C3d	Dendrímteros	Diabetes tipo I	Agentes neurotróficos	
Preclínica	FGL-4 FGL-D	Dendrímteros	Tratamiento ictus y desórdenes Cognitivos	Activadores FGFR1	Enkam
Preclínica	BD-C225 C225-G5- B1100	Dendrímteros radiosensibilizantes	Fármacos oncolíticos		Ohio State University
Preclínica	Gd-D1	Complejos Dendrímtero-Gadolinio	Agentes para RMN		Mitsubishi Tanabe Pharma
Diagnóstico biológico		Dendrímteros	Tratamiento trastornos renales e hiperparatoidismo		Genzyme

CONCLUSIONES

En conclusión, los dendrímeros son polímeros sintéticos con una forma globular extremadamente bien definida y con una serie de propiedades inmejorables para su uso en aplicaciones biológicas. Responden de forma predecible en solución, pueden ser modificados ampliamente para portar múltiples ligandos

con actividad biológica, pueden atravesar barreras biológicas, y son fabricados con muy pocos defectos estructurales, lo cual hace fácil su análisis por medios tales como espectrometría de masas, espectroscopía de infrarrojos o resonancia magnética nuclear (RMN).

Existen distintos tipos de dendrímeros diferentes en su química que están siendo estudiados para transfección de genes u oligonucleótidos, transportadores de fármacos, diseño de vacunas, interacciones huésped-receptor, biosensores, etc. Es importante resaltar que los dendrímeros tienen una enorme aplicación también en otros campos tales como la cosmética, electrónica, fotónica, industrias químicas, entre otros. Desde tecnología basada en dendrímeros para formar pelotas de golf (US patent 7101951), hasta productos nanoscópicos para el pelo que incluyen dendrímeros (US Patent 0072728). En este sentido, la compañía ExxonMobil es propietaria de una patente basada en tecnología de dendrímeros donde se utilizan para incrementar el flujo del aceite a temperaturas muy frías. También el US Army Research Laboratory está desarrollando un agente de detección de anthrax basado en dendrímeros, llamado «Alert Ticket».

La irrupción en el campo de la Biomedicina de estas macromoléculas dará lugar a la aparición de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico empleando fármacos y moléculas ya conocidos o de nueva aparición, que se combinarán con los dendrímeros para adquirir nuevas compuestos farmacéuticos con alto grado de especialización, seguridad y eficacia ofreciendo un alto valor terapéutico y de bienestar a la sociedad.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Dykes, G.M., Brierley, L.J., Smith, D.K., McGrail, P.T. & Seeley, G.J. (2001) Supramolecular solubilisation of hydrophilic dyes by using individual dendritic branches. *Chemistry*. 7: 4730-9.
- (2) Boas, U. & Heegaard, P.M. (2004) Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* 33: 43-63.
- (3) Buhleier, W.W. & Vögtle, F. (1978) Cascade and Nonskid-chain-like Synthesis of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis*. 2: 155-158.
- (4) R. G. Denkewalter, J.F.K.a.W.J.L. (1983) Patent US4410688, 1983.ed.^eds)
- (5) Tomalia, D.A., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J. & Smith, P. (1985) A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* 17: 117-132.

- (6) de Brabrand van den Berg, E.M.M. & Meijer, E.W. (1993) Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 1308-1311.
- (7) C. J. Hawker, K.L.W.a.J.M.J.F. (1993) Unimolecular micelles and globular amphiphiles dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*: 1287-1297.
- (8) Turnbull, W.B. & Stoddart, J.F. (2002) Design and synthesis of glycodendrimers. *J. Biotechnol.* 90: 231-55.
- (9) Majoral, J.P. & Caminade, A.M. (1999) Dendrimers containing heteroatoms (si, p, B, ge, or bi). *Chem. Rev.* 99: 845-80.
- (10) Kim, R.R.a.J.M. (1999) Amphiphilic p-tert-Butylcalix[4]arene Scaffolds Containing Exposed Carbohydrate Dendrons. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 369-372.
- (11) Ortega, P. et al. (2006) Novel water-soluble carbosilane dendrimers: Synthesis and biocompatibility. *Eur. J. Inorg. Chem.* 7: 1388-1396.
- (12) A. W. Bosman, H.M.J.a.E.W.M. (1999) About dendrimers: Structure, physical properties, and applications. *Chem. Rev.* 99: 1665-1688.
- (13) Frechet, C.J.H.a.J.M.J. (1990) A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 7638-7647.
- (14) Avnir, D.F.a.D. (1991) Surface Fractality of Dendrimers. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 30: 1379-1380.
- (15) Jackson, C.L., Chanzy, H.D., Booy, F.P., Drake, B.J., Tomalia, D.A., Bauer, B.J. & Amis, E.J. (1998) Visualization of Dendrimer Molecules by Transmission Electron Microscopy (TEM): Staining Methods and Cryo-TEM of Vitrified Solutions. *^eds*), pp. 6259-6265.
- (16) Lee, B.D.A., Wetzel, A.W., Meixner, W. & Baker, J.R. (2002) Structural Molecular Dynamic Studies on Therapeutically-Applied Polyamidoamine Dendrimers: The Effects of pH and Surface Derivatization Group. *Macromolecules.* 35
- (17) W. Chen, D.A.T.a.J.L.T. (2000) *Macromolecules.* 33: 9169-9172.
- (18) Autumn, K., Liang, Y.A., Hsieh, S.T., Zesch, W., Chan, W.P., Kenny, T.W., Fearing, R. & Full, R.J. (2000) Adhesive force of a single gecko foot-hair. *Nature.* 405: 681-5.
- (19) Lundquist, J.J., Debenham, S.D. & Toone, E.J. (2000) Multivalency effects in protein—carbohydrate interaction: the binding of the Shiga-like toxin 1 binding subunit to multivalent C-linked glycopeptides. *J. Org. Chem.* 65: 8245-50.
- (20) Ehrlich, P.H. (1979) The effect of multivalency on the specificity of protein and cell interactions. *J. Theor. Biol.* 123-127.

- (21) M. Mammen, S.-K.C.a.G.M.W. (1998) Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 2754-2794.
- (22) J. B. Corbell, J.J.L.a.E.J.T. (2000) A comparison of biological and calorimetric analyses of multivalent glycodendrimer ligands for concanavalin A. 11: 95-111.
- (23) Rittner, A.B., Bompard, S., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R. & Jacobs, E. (2002) New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol. Therapy.* 5: 104-114.
- (24) Jevprasesphant, R., J.P., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N.B. & D'Emanuele, A. (2003) The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* 252: 263-266.
- (25) El Sayed, M., M.G., Rhodes, C. & Ghandehari, H. (2002) Transepithelial Transport of Polyamidoamine Dendrimers Across Caco-2 Cell Monolayers. *J. Controlled Release.* 81: 355-365.
- (26) Roberts, J.C., Bhalgat, M.K. & Zera, R.T. (1996) Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.* 30: 53-65.
- (27) Malik, N. et al. (2000) Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release.* 65: 133-48.
- (28) Brazeau, G.A., Attia, S., Poxon, S. & Hughes, J.A. (1998) In vitro myotoxicity of selected cationic macromolecules used in non-viral gene delivery. *Pharm. Res.* 15: 680-4.
- (29) Supattapone, S., H.-O.B.N., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. & Scott, M. (1999) Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 14529-14534.
- (30) Fischer, D., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. & Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials.* 24: 1121-1131.
- (31) Zinselmeyer, B.H., Mackay, S.P., Schatzlein, A.G. & Uchegbu, I.F. (2002) The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents. *Pharm. Res.* 19: 960-7.
- (32) Chonco, L., Rasines, B., Gomez, R., De la Mata, F.J. & Munoz-Fernandez, M.A. (2008) Prevention of HIV-mucosal barrier interaction by new synthesized carbosilane polyanionic dendrimers. In Trends in Nanotechnology ed.^eds), Oviedo (Spain).
- (33) Yoo, H. & Juliano, R.L. (2000) Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res.* 28: 4225-31.

- (34) Bielinska, A., Kukowska-Latallo, J.F., Johnson, J., Tomalia, D.A. & Baker, J.R., Jr. (1996) Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res.* 24: 2176-82.
- (35) Shah, D.S., Sakthivel, T., Toth, I., Florence, A.T. & Wilderspin, A.F. (2000) DNA transfection and transfected cell viability using amphipathic asymmetric dendrimers. *Int. J. Pharm.* 208: 41-8.
- (36) Chonco, L. et al. (2007) Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins. *Org. Biomol. Chem.* 5: 1886-93.
- (37) Weber, N., Ortega, P., Clemente, M.I., Shcharbin, D., Bryszewska, M., de la Mata, F.J., Gomez, R. & Munoz-Fernandez, M.A. (2008) Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *J. Control. Release.* 132: 55-64.
- (38) Gebhart, C.L. & Kabanov, A.V. (2001) Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J. Control. Release.* 73: 401-16.
- (39) Andrews, J.M., Newbound, G.C. & Lairmore, M.D. (1997) Transcriptional modulation of viral reporter gene constructs following induction of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res.* 25: 1082-4.
- (40) Bourne, N., Stanberry, L.R., Kern, E.R., Holan, G., Matthews, B. & Bernstein, D.I. (2000) Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2471-4.
- (41) Rajanathanan, P., Attard, G.S., Sheikh, N.A. & Morrow, W.J. (1999) Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses. *Vaccine.* 17: 715-30.
- (42) Padilla De Jesus, O.L., H.R.I., Gagne, L., Frechet, J.M., & Szoka, F.C. Jr. (2002) Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: Design, Synthesis, and Characterization. *Bioconjugate Chem.* 13: 453-461.
- (43) Ihre, H.R., D.P., Szoka, F.C., & Frechet, J.M. (2002) Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: Design, Synthesis, and Characterization. *Bioconjugate Chem.* 13: 443-452.
- (44) Kobayashi, H. et al. (2001) Positive effects of polyethylene glycol conjugation to generation-4 polyamidoamine dendrimers as macromolecular MR contrast agents. *Magn. Reson. Med.* 46: 781-8.
- (45) Wimmer, N., Marano, R.J., Kearns, P.S., Rakoczy, E.P. & Toth, I. (2002) Syntheses of polycationic dendrimers on lipophilic peptide core for complexation and transport of oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2635-7.

- (46) Roessler, B.J., Bielinska, A.U., Janczak, K., Lee, I. & Baker, J.R., Jr. (2001) Substituted beta-cyclodextrins interact with PAMAM dendrimer-DNA complexes and modify transfection efficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 124-9.
- (47) Mannistö, M., Toncheva, V., Elomaa, M., Ruponen, M., Schacht, E. & Urtti, A. (2002) Structure-activity relationships of poly(l-lysines): effects of pegylation and molecular shape on physicochemical and biological properties in gene delivery. *J. Controlled Release.* 83: 169-182.
- (48) Tang, M.X., Redemann, C.T. & Szoka, F.C., Jr. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 7: 703-14.
- (49) El-Sayed, M., Kiani, M.F., Naimark, M.D., Hikal, A.H. & Ghandehari, H. (2001) Extravasation of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers across microvascular network endothelium. *Pharm. Res.* 18: 23-8.
- (50) Wiwattanapatapee, R., Carreno-Gomez, B., Malik, N. & Duncan, R. (2000) Anionic PAMAM dendrimers rapidly cross adult rat intestine in vitro: a potential oral delivery system? *Pharm. Res.* 17: 991-8.
- (51) J. F. G. A. Jansen, E.W.M.a.E.M.M.d.B.v.d.B. (1996) The dendritic box and bengal rose. *Macromol. Symp.* 102: 27-33.
- (52) Evangelista-Lara, A. & Guadarrama, P. (2005) Theoretical evaluation of the nano-carrier properties of two families of functionalized dendrimers. *^eds*, pp. 460-470
- (53) Twyman, L.J., A.E.B., Esfand, R., Hardy, M.J. & Mitchell, J.C. (1999) The synthesis of water soluble dendrimers and their application as possible drug delivery systems. *Tetrahedron Lett.* 40: 1743-1746.
- (54) Shcharbin, D. et al. (2007) Analysis of interaction between dendriplexes and bovine serum albumin. *Biomacromolecules.* 8: 2059-62.
- (55) Bermejo, J.F. et al. (2007) Water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chemistry.* 13: 483-95.
- (56) Hughes, J.A., Aronsohn, A.I., Avrutskaya, A.V. & Juliano, R.L. (1996) Evaluation of adjuvants that enhance the effectiveness of antisense oligodeoxynucleotides. *Pharm. Res.* 13, 404-10.
- (57) Yoo, H., Sazani, P. & Juliano, R.L. (1999) PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Pharm. Res.* 16: 1799-804.
- (58) Lebedeva, I., Benimetskaya, L., Stein, C.A. & Vilenchik, M. (2000) Cellular delivery of antisense oligonucleotides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 101-19.
- (59) Jaaskelainen, I., Peltola, S., Honkakoski, P., Monkkonen, J. & Urtti, A. (2000) A lipid carrier with a membrane active component and a small complex size are re-

- quired for efficient cellular delivery of anti-sense phosphorothioate oligonucleotides. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10: 187-93.
- (60) GossI, I., Shu, L., Schluter, A.D. & Rabe, J.P. (2002) Molecular structure of single DNA complexes with positively charged dendronized polymers. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 6860-5.
- (61) Tang, M.X. & Szoka, F.C. (1997) The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* 4: 823-32.
- (62) Dennig, J. & Duncan, E. (2002) Gene transfer into eukaryotic cells using activated polyamidoamine dendrimers. *J. Biotechnol.* 90: 339-47.
- (63) Kono, K., Liu, M. & Frechet, J.M. (1999) Design of dendritic macromolecules containing folate or methotrexate residues. *Bioconjug. Chem.* 10: 1115-21.
- (64) Quintana, A. et al. (2002) Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm. Res.* 19: 1310-6.
- (65) Shukla, G.W., Chatterjee, M., Yang, W., Sekido, M., Diop, L.A., Muller, R., Sudimack, J. J., Lee, R. J., Barth, R.F. & W. Tjarks, W. (2003) Synthesis and biological evaluation of folate receptor-targeted boronated PAMAM dendrimers as potential agents for neutron capture therapy. *Bioconjugate Chem.* 14: 158-167.
- (66) Malik, N., Evagorou, E.G. & Duncan, R. (1999) Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs.* 10: 767-76.
- (67) Balogh, L., Tomalia, D.A., Hagnauer, G.L. & McManus, A.T. (2001) Dendrimer-Silver Complexes and Nanocomposites as Antimicrobial Agents. *Nano Lett.* 1, 18-21.
- (68) R. X. Zhuo, B.D.a.Z.R.L. (1999) In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer. *J. Controlled Release.* 57: 249-257.
- (69) Boyd, W.C. & Shapleigh, E. (1954) Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. *J. Immunol.* 73: 226-31.
- (70) Roy, R. (1996) Syntheses and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 692-702.
- (71) Veprek, P. & Jezek, J. (1999) Peptide and glycopeptide dendrimers. Part II. *J. Pept. Sci.* 5: 203-20.
- (72) Andre, S., Pieters, R.J., Vrasidas, I., Kaltner, H., Kuwabara, I., Liu, F.T., Liskamp, R.M. & Gabius, H.J. (2001) Wedgelike glycodendrimers as inhibitors of binding of mammalian galectins to glycoproteins, lactose maxiclusters, and cell surface glycoconjugates. *ChemBiochem.* 2: 822-30.

- (73) R. Roy, M.G.B.a.O.R. (2001) Synthesis of N,N '-bis(acrylamido)acetic acid-based T-antigen glycodendrimers and their mouse monoclonal IgG antibody binding properties. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 1809-1816.
- (74) Chauhan, A.S., Chalasani, K.B., Jain, A. K., Jain, S.K., Jain, N.K., & Diwan, P.V. (2003) Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *J. Control. Rel.* 90: 335-343.
- (75) Gong, Y. et al. (2002) Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Anti-viral Res.* 55: 319-29.
- (76) Witvrouw, M. et al. (2000) Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle. *Mol. Pharmacol.* 58: 1100-8.
- (77) Witvrouw, M., Weigold, H., Pannecouque, C., Schols, D., De Clercq, E. & Holan, G. (2000) Potent anti-HIV (type 1 and type 2) activity of polyoxometalates: structure-activity relationship and mechanism of action. *J. Med. Chem.* 43: 778-83.
- (78) Landers, J.J. et al. (2002) Prevention of influenza pneumonitis by sialic Acid-conjugated dendritic polymers. *J. Infect. Dis.* 186: 1222-30.
- (79) Cooper, C.Z.C.a.S.L. (2002) Interactions Between Dendrimer Biocides and Bacterial Membranes. *Biomaterials.* 23: 3359-3368.
- (80) Chen, C.Z., Beck-Tan, N.C., Dhurjati, P., van Dyk, T.K., LaRossa, R.A. & Cooper, S.L. (2000) Quaternary ammonium functionalized poly(propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: structure-activity studies. *Biomacromolecules.* 1: 473-80.
- (81) Nagahori, N., Lee, R.T., Nishimura, S., Page, D., Roy, R. & Lee, Y.C. (2002) Inhibition of adhesion of type 1 fimbriated Escherichia coli to highly mannosylated ligands. *ChemBiochem.* 3: 836-44.
- (82) Ortega, P., Copa-Patino, J.L., Munoz-Fernandez, M.A., Soliveri, J., Gomez, R. & de la Mata, F.J. (2008) Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies. *Org. Biomol. Chem.* 6: 3264-9.
- (83) Devasagayam, T.P. & Kamat, J.P. (2002) Biological significance of singlet oxygen. *Indian J. Exp. Biol.* 40: 680-92.
- (84) Battah, S.H., Chee, C.E., Nakanishi, H., Gerscher, S., MacRobert, A.J. & Edwards, C. (2001) Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjug. Chem.* 12: 980-8.

- (85) Nishiyama, N., Stapert, H.R., Zhang, G.D., Takasu, D., Jiang, D.L., Nagano, T., Aida, T. & Kataoka, K. (2003) Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioconjug. Chem.* 14: 58-66.
- (86) Supattapone, S.B.P.a.S. (2002) ed.^eds), pp. 31. 0041859, USA.
- (87) Van Regenmortel, M.H., Muller, S. & Plaue, S. (1988) Synthetic Polypeptides as Antigens. Amsterdam.
- (88) Sadler, K. & Tam, J.P. (2002) Peptide dendrimers: applications and synthesis. *J. Biotechnol.* 90: 195-229.
- (89) Spetzler, J.C. & Tam, J.P. (1996) Self-assembly of cyclic peptides on a dendrimer: multiple cyclic antigen peptides. *Pept. Res.* 9: 290-6.
- (90) Moreno, C.A., Rodriguez, R., Oliveira, G.A., Ferreira, V., Nussenzweig, R.S., Moya Castro, Z.R., Calvo-Calle, J.M. & Nardin, E. (1999) Preclinical evaluation of a synthetic Plasmodium falciparum MAP malaria vaccine in Aotus monkeys and mice. *Vaccine.* 18: 89-99.
- (91) Ota, S., Ono, T., Morita, A., Uenaka, A., Harada, M. & Nakayama, E. (2002) Cellular processing of a multibranch lysine core with tumor antigen peptides and presentation of peptide epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes on antigen-presenting cells. *Cancer Res.* 62: 1471-6.
- (92) De Oliveira, E., Villen, J., Giralt, E. & Andreu, D. (2003) Synthetic approaches to multivalent lipopeptide dendrimers containing cyclic disulfide epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Bioconjug. Chem.* 14: 144-52.
- (93) Nardin, E.H. et al. (2001) A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing Plasmodium falciparum B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. *J. Immunol.* 166: 481-9.
- (94) Nardin, E.H. et al. (2000) Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. *J. Infect. Dis.* 182: 1486-96.
- (95) Bay, S., Lo-Man, R., Osinaga, E., Nakada, H., Leclerc, C. & Cantacuzene, D. (1997) Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen. A possible approach to a synthetic carbohydrate vaccine. *J. Pept. Res.* 49: 620-5.
- (96) Dear, J.W., Kobayashi, H., Jo, S.K., Holly, M.K., Hu, X., Yuen, P.S., Brechbiel, M.W. & Star, R.A. (2005) Dendrimer-enhanced MRI as a diagnostic and prognostic biomarker of sepsis-induced acute renal failure in aged mice. *Kidney Int.* 67: 2159-67.
- (97) Rupp, R., Rosenthal, S.L. & Stanberry, L.R. (2007) VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer—microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int. J. Nanomedicine.* 2: 561-6.

- (98) Myc, A., Douce, T.B., Ahuja, N., Kotlyar, A., Kukowska-Latallo, J., Thomas, T.P. & Baker, J.R., Jr. (2008) Preclinical antitumor efficacy evaluation of dendrimer-based methotrexate conjugates. *Anticancer Drugs*. 19: 143-9.